

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-332579

(43)公開日 平成11年(1999)12月7日

(51)Int.Cl.⁶
 C 12 N 15/09
 A 61 K 38/43
 C 07 K 14/47
 16/18
 C 12 N 9/10

識別記号
 ZNA
 ADQ

F I
 C 12 N 15/00
 C 07 K 14/47
 16/18
 C 12 N 9/10
 C 12 Q 1/68

ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数 7 FD (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-162865

(22)出願日 平成10年(1998)5月26日

(71)出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72)発明者 尾崎 浩一

徳島県徳島市南末広町2-67-606

(72)発明者 岩下 修一

徳島県徳島市川内町加賀須野463-30 今
切寮

(72)発明者 藤原 力

徳島県鳴門市鳴門町高島字中島436

(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外10名)

(54)【発明の名称】 T S C501遺伝子

(57)【要約】

【課題】特に薬物代謝促進剤として有用な新規な遺伝子を提供。

【解決手段】例えば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)及び(b)のいずれかの蛋白質をコードする塩基配列を含むTSC501遺伝子。

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つアセチルトランスフェラース活性を有する蛋白質

【請求項2】塩基配列が配列番号：2で示されるものである請求項1に記載のTSC501遺伝子。

【請求項3】以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなるTSC501遺伝子：

(i) 配列番号：3で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド

(ii) 配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

【請求項4】ヒト遺伝子である請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項5】TSC501遺伝子検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片である請求項3に記載の遺伝子。

【請求項6】以下の(a)及び(b)の組換えTSC501蛋白質。

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つアセチルトランスフェラース活性を有する蛋白質

【請求項7】請求項6に記載のTSC501蛋白質に結合性を有する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、腎臓及び肝臓特異的に発現し、薬物代謝に関連する遺伝子及び該遺伝子によりコードされる新規な蛋白質及びその特異抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内で合成された蛋白質や生体に取り込まれた薬物、毒物は、リン酸化、メチル化、アセチル化等の種々の修飾反応を触媒する酵素によって、その活性を調節されることが知られている。

【0003】上記酵素のうちでも、アセチルトランスフェラース(acetyltransferase)は、アセチル補酵素A(acetyl CoA)から蛋白質や薬物、毒物等にアセチル基を転移させるアセチル化反応を触媒しており、生体内に投与された各種薬物、生体に取り込まれた毒物、不要な蛋白質等の代謝による活性の調節に関与しており、主と

して薬物代謝作用を有するとされている。しかるに、現在その詳しい薬物代謝機構は解明されていない。

【0004】かかるアセチルトランスフェラース等の薬物代謝に関与する酵素等の生理的役割の解明とそれにより得られる情報は、薬物代謝機構の解明に重要であり、基礎科学研究の分野はもとより、医薬品分野においても、新薬開発等の面から望まれるところである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、斯界で要望される前記の情報を提供することを目的としており、特にアセチルトランスフェラースに相容性を有し、生体内における薬物代謝に関与する新規な蛋白質及びこれをコードする遺伝子を提供することを目的とする。

【0006】本発明者は、各種ヒト組織由来の遺伝子につき検索を重ねた結果、腎臓及び肝臓に特異的に発現しており、各種のアセチルトランスフェラースと一定の相容性を有し、薬物代謝に関連する代謝を調節する酵素をコードする新しい遺伝子の単離、同定に成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明によれば、以下の(a)及び(b)のいずれかの蛋白質をコードする塩基配列を含むTSC501遺伝子、特に配列番号：2で示される塩基配列を含む当該遺伝子、ヒト遺伝子である之等の遺伝子が提供される。

【0008】(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つアセチルトランスフェラース活性を有する蛋白質。

【0009】また、本発明によれば、以下の(a)及び(b)のいずれかのポリヌクレオチドからなるTSC501遺伝子、特にヒト遺伝子である当該遺伝子が提供される。

【0010】(i) 配列番号：3で示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【0011】更に、本発明によれば、TSC501遺伝子の検出用の特異プローブ又は特異プライマーとして使用されるDNA断片である上記遺伝子が提供される。

【0012】加えて、本発明によれば、上記(a)及び(b)のいずれかの蛋白質である組換えTSC501蛋白質及びこれに結合性を有する抗体が提供される。

【0013】以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (198

4])、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「TSC501a」と名付けられたPCR産物のDNA配列から演繹されるものを挙げることができ、その塩基配列は配列番号：3に示されるとおりである。

【0015】該遺伝子は、配列番号：1に示される227アミノ酸配列(推定分子量：約25kDa)の新規な、腎臓及び肝臓に特異的に発現している、薬物代謝を調節する酵素をコードするオープンリーディングフレームを含むヒトcDNA(全長：約1.0kb)であり、該酵素は、薬物代謝に重要な役割を演じていると考えられる。

【0016】本発明遺伝子(以下「TSC501遺伝子」という)の発現産物である蛋白質(以下「TSC501蛋白質」という)の一例である上記蛋白(酵素)は、FASTAプログラム(Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 85, 2444-2448 (1988))を利用したGenBank/EMBLデータベースによるホモジ一解析の結果、C末端側において、(1)ゲンタマイシン3'アセチルトランスフェラーゼ(gentamicin 3'-acetyltransferase (AAC(3)-I); W. Wohlleben, et al., Mol. Gen. Genet., (1989), 217: 202-208)、(2)リボソーム蛋白ーアラニンアセチルトランスフェラーゼ(ribosomal-protein-alanine acetyltransferase (Rim I); A. Yoshikawa, et al., Mol. Gen. Genet. (1987), 209: 481-488)及び(3)ストレプトセリシンアセチルトランスフェラーゼ(streptothrin acetyltransferase (Sta T); S. Horinouchi, et al., J. Bacteriol., (1987), pp. 1929-1937)と、それぞれ、29%、26%及び27%の相同性を示し、之等及びその他の各種アセチルトランスフェラーゼと有意な同一性が確認された。

【0017】また、上記蛋白は、コンピューター解析による蛋白質構造の解析によって、細胞膜貫通領域が1ヶ所存在することが示唆され、このことより、本発明TSC501蛋白質は、細胞膜蛋白質である可能性が高いことが判明した。

【0018】ノーザン解析の結果、本発明TSC501遺伝子は、正常腎臓及び肝臓に特異的に発現することが解明された。しかして、上記腎臓及び肝臓は、薬物代謝を行なっている臓器であり、本発明遺伝子はこれら臓器に特異的に発現される点からも、薬物代謝に関連する遺伝子であることが判った。

【0019】以上のように、本発明TSC501遺伝子及びその遺伝子産物の提供は、殊に生体の薬物代謝及びその調節機構の解明に有用な情報を与え、このことから、本発明遺伝子及びその発現産物は、特に、生体に投

与される各種薬物の代謝促進剤として好適に利用できる。

【0020】本発明遺伝子は、具体的には、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子又は配列番号：2で示される塩基配列を含む遺伝子として例示されるが、特にこれらに限定されることなく、例えば、上記アミノ酸配列中に一定の改変を有する遺伝子や、上記塩基配列と一定の相同性を有する遺伝子であることができる。

【0021】即ち、本発明遺伝子には、配列番号：1に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、アセチルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする塩基配列及びこれらを含む遺伝子もまた包含される。ここで、「アミノ酸の欠失、置換もしくは付加」の程度及びそれらの位置は、改変された蛋白質が、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と同様の機能を有する同効物であれば特に制限されない。上記複数個には、2以上、通常数個が含まれる。

【0022】尚、これらアミノ酸配列の改変(変異)は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあり、天然由来の遺伝子(例えば本発明の具体例遺伝子)に基づいて人為的にこれを行わせることもできる。本発明遺伝子には、このような改変・変異の原因及び手段を問わず、上記特性を有する全ての改変遺伝子が包含される。

【0023】上記の人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス(Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987); 同100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); 純生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)]等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段(J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); 同91: 3350 (1969); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); 同24: 245 (1983)]及びそれらの組合せが例示できる。

【0024】本発明遺伝子のひとつの態様としては、配列番号：3で示される塩基配列の全部或は一部を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子を例示できる。この塩基配列に含まれるオープンリーディングフレームは、上記アミノ酸配列(配列番号：1)の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せであり、本発明遺伝子はこの例に限らず、各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮することができる(Nucleic Acids Res., 9: 43 (1981))。

【0025】また、本発明遺伝子は、例えば配列番号：3の具体例で示されるように、一本鎖DNAの塩基配列

として表示されるが、本発明はかかる塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドやこれらの両者を含むコンポーネントも当然に包含し、また、cDNA等のDNAに限定されることもない。

【0026】更に、本発明遺伝子は、前記のとおり、配列番号：3に示される塩基配列の全部又は一部を含むポリヌクレオチドからなるものに限定されず、当該塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含する。かかる遺伝子としては、少なくとも、下記に掲げるようなストリンジメントな条件下で、配列番号：3で示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、一定の条件下での洗浄によってもこれより脱離しないものが挙げられる。

【0027】即ち、上記一定の相同性を有する塩基配列には、配列番号：3の塩基配列を有するDNAと、 $6 \times$ SSC中65℃一夜の条件下或は50%ホルムアミドを含む $4 \times$ SSC中37℃一夜の条件下においてハイブリダイズし、 $2 \times$ SSC中65℃での30分間の洗浄条件下においても該DNAから脱離しない塩基配列が含まれる。ここで、SSCは、標準食塩-クエン酸緩衝液である (standard salinecitrate; 1×SSC = 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate)。

【0028】本発明遺伝子は、その具体例についての配列情報に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる [Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I, II, III」、日本生化学会編 (1986) 等参照]。

【0029】具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローニングを選択することにより、本発明遺伝子を得ることができる [上記手法については、例えばProc. Natl. Acad. Sci., USA., 78: 6613 (1981); Science, 222: 778 (1983) 等参照]。

【0030】上記において、cDNAの起源としては、本発明遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示される。これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニング等は、いずれも常法に従い実施できる。

尚、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれら市販のcDNAライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.) より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

【0031】本発明遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的方法としては、例えばcDNAにより產生される蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより、対応するcDNAクローニングを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合する

プローブを用いたブラークハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等やこれらの組合せを例示できる。

【0032】ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAが一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片等も良好に利用できる。

【0033】また、本発明遺伝子のスクリーニングは、上記特異抗体に代えてTSC501蛋白質を利用した蛋白質相互作用クローニング法 (protein interaction cloning procedure) によることもでき、更に、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いる方法によることもできる。

【0034】本発明では、またディファレンシャルディスプレイ法 (differential displaymethod; Li and P., et al., Science, 257, 967-971 (1992)) によって、異なる条件下的細胞もしくは複数の異なる細胞群間のmRNAの発現を直接比較、検討することができる。

【0035】本発明遺伝子の取得に際しては、PCR法 [Science, 230: 1350 (1985)] によるDNA/RNA增幅法も好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難い場合には、レース法 (RACE: Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学、12(6): 35 (1994))、殊に5'一レース (5'-RACE) 法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8: 8998 (1988)] 等の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によつて明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従い合成できる。

【0036】尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法等によればよい。

【0037】上記で得られる本発明遺伝子或は各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74: 5463 (1977)] やマキサムーギルバート法 [Method in Enzymology, 65: 499 (1980)] 等に従って、また簡便には市販のシークエンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0038】本発明遺伝子の利用によれば、一般的の遺伝子工学的手法を用いることにより、その遺伝子産物 (蛋白質乃至酵素) を容易に大量に安定して製造することができる。従って、本発明は、本発明にかかるTSC501遺伝子を含有するベクター (発現ベクター) 及び該ベクターによって形質転換された宿主細胞並びに該宿主細胞を培養することによりTSC501蛋白質を製造する方法をも提供するものである。

【0039】該蛋白質の製造は、通常の遺伝子組換え技術 [Science, 224: 1431 (1984); Biochem. Biophys. R

es. Comm., 130: 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 5990 (1983) 及び前記引用文献等参照]に従って実施できる。

【0040】上記宿主細胞としては、原核生物及び真核生物のいずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが広く挙げられ、好適には大腸菌、とりわけエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12株に含まれるものを見出せる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞である COS 細胞 [Cell, 23: 175 (1981)] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77: 4216 (1980)] 等が、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞等が好適に用いることができる。勿論、これらに限定される訳ではない。

【0041】原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及び SD (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン (例えば ATG) を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来のプラスミド、例えば pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 等がよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができます。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、例えば pGEX-4T (Amersham Pharmacis Biotech社)、pMAL-C2, pMAL-P2 (New EnglandBiolabs社)、pET21, pET21/1a-cq (Invitrogen社)、pBAD/His (Invitrogen社) 等を例示できる。

【0042】脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えば SV40 の初期プロモーターを保有する pSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)] 等が例示できる。上記以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えば pEGFP-N, pEGFP-C (Clontech社)、pIND (Invitrogen社)、pcDNA3.1/His (Invitrogen社) 等の動物細胞用ベクターや、pFastBac HT (Gibco BRL社)、pAcGHLT (PharMingen社)、pAc5/V5-His, pMT/V5-His, pMT/Bip/V5-his (以上 Invitrogen 社) 等の昆虫細胞用ベクター等が挙げられる。

【0043】また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する pAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)] 等が例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えば pPICZ (Invitrogen社)、pPICZα (Invitrogen社) 等が含まれる。

【0044】プロモーターとしても特に限定なく、エッシュエリヒア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン (trp) プロモーター、lpp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、PL/PR プロモーター等を好ましく利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーター等が好ましい。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えば pH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター等を好適に利用できる。また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40 由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRα プロモーター等を例示できる。

【0045】尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白として発現させるための pGEX (Promega社) 等を例示できる。

【0046】所望の組換え DNA (発現ベクター) の宿主細胞への導入法・形質転換法としても特に制限はなく、一般的な各種方法を採用できる。得られる形質転換体も、常法に従いこれを培養することができ、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の TSC501 蛋白質が発現・産生され、形質転換体の細胞内、細胞外若しくは細胞膜上に蓄積もしくは分泌される。

【0047】上記培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

【0048】かくして得られる組換え蛋白質 (TSC501 蛋白質) の有するアセチルトランスフェラーゼ活性の測定は、例えば [¹⁴C]-アセチルCoA と TSC501 蛋白質とをゲンタマイシン、ストレプトマイシン等の抗生物質 (薬物) の存在下で反応させ、生成した [¹⁴C]-薬物を有機層であるシンチレーターに拡散させて、その生成量を液体シンチレーションカウンターで測定することにより実施できる [Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989, 16.30-16.55/16.56-16.67; Ausubel, F.M., et al., Curen-

t Protocols in Molecular Biology (New York, John Wiley and Sons, 1990, 9.0-9.5/9.6.1-9.6.9)。

【0049】上記形質転換体の培養は、より詳しくは、前記した発現ベクター中に所望のTSC501遺伝子を組込んで形質転換させた形質転換体を含む培養細胞又は培養細胞の細胞抽出精製物を用いて、例えば以下の如くして実施できる。即ち、まず10m1のPBSで前記細胞を洗浄後、ラバーポスマンを用いて細胞を10m1PBSに懸濁させ、2000rpm、4℃、5分間遠心分離した後、沈殿物（細胞）を回収する。次いで、回収した細胞を100μlの0.25Mトリス-塩酸（pH7.5）に、1～2mg/m1となるように懸濁させた後、液体窒素を用いた凍結操作（又は-80℃超低温冷蔵庫に5分間放置による）と融解操作とを4回繰り返した後、15000rpm、4℃、10分間遠心分離し、上清を回収する。

【0050】かくして回収した上清は、これを直ちに測定に供しない場合は、-80℃で保存しておくことができる、また例えばその一部をバイオーラッド・プロテイン・アッセイ等に供して蛋白質を定量することもできる。

【0051】上記上清の20～200μg蛋白質を0.25Mトリス-塩酸（pH7.5）を用いて25μlにメスアップし、該蛋白質溶解溶液に50μlの0.1μCi [¹⁴C]クロラムフェニコール（Amersham社等）を含む0.25Mトリス-塩酸（pH7.5）と10μlの10mMアセチルCoA（和光純薬社、シグマ社等）を加えて、37℃で1時間インキュベートする。これに300μl酢酸エチルを加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、15000rpm、4℃、10分間遠心分離し、上清250μlを別の1.5m1チューブに取り、更に250μl酢酸エチルを加える。次いでボルテックスミキサーを用いて攪拌し、上記と同様に遠心分離後、上清250μlを前記の1.5m1チューブに加える。合計500μl酢酸エチルを濃縮遠心機を用いて蒸発乾固して、抽出物を20μl酢酸エチルに溶かし、シリカゲル薄層プレートに1cm間隔にディスポーザルマイクロピペットを用いるか又はピペットマンを用いて0.5μlずつスポットする。

【0052】予めチャンバー内をクロロホルム-メタノール（95:5）で飽和させておき、20～30分間分離を行い、数分後、室温で乾燥し、一晩オートラジオグラフィーを行い、アセチル化体及び非アセチル化体のそれぞれのカウントを別々にイメージ・アナライザー（Fuji社製：BSA2000等）又は液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製等）にて測定することによって、TSC501蛋白質のアセチルトランスフェレース活性の測定を行うことができる。

【0053】組換え蛋白質（TSC501蛋白質）は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作に従って分離、精製することができる

〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；Bioc hemistry, 25(25): 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163: 313 (1987) 等参照〕。

【0054】該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等が挙げられ、特に好ましい上記方法としては、本発明蛋白質に対する特異抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

【0055】しかして、本発明は、例えば上記の如くして得られる、新規なTSC501蛋白質自身をも提供するものである。該蛋白質は、アセチルトランスフェレースと相同性を有し、その有するアセチル化反応促進作用（アセチルトランスフェレース活性）乃至薬物代謝作用を有することにより特徴付けられ、前記のとおり医薬分野において有用である。

【0056】また、このTSC501蛋白質は、該蛋白質の特異抗体を作成するための免疫抗原としても利用できる。ここで抗原として用いられるコンポーネントは、例えば上記遺伝子工学的手法に従って大量に產生された蛋白質或はそのフラグメントであることができ、これら抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローン抗体）及びモノクローナル抗体を取得することができる。

【0057】該抗体の製造方法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔統生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）等参照〕。

【0058】上記抗血清の取得に際して利用される免疫動物としては、例えばウサギ、モルモット、ラット、マウスやニワトリ等の通常動物を任意に選択でき、上記抗原を使用する免疫方法や採血等もまた常法に従い実施できる。

【0059】モノクローナル抗体の取得も、常法に従い、上記免疫抗原で免疫した動物の形質細胞（免疫細胞）と形質細胞腫細胞との融合細胞を作成し、これより所望抗体を產生するクローンを選択し、該クローンの培養により実施することができる。免疫動物は、一般に細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択され、通常マウスやラット等が有利に用い得る。免疫化は、上記抗血清の場合と同様にして実施でき、また所望により免疫抗原を通常のアジュバント等と併用して用いることもできる。

【0060】尚、融合に使用される形質細胞腫細胞とし

ても、特に限定なく、例えば p 3 (p3/x63-Ag8) [Nature, 256: 495-497 (1975)]、p 3-U 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8: 405-415 (1976)]、S P 2/0 [Nature, 276: 269-271 (1978)] 等、ラットにおける R 210 [Nature, 277: 131-133 (1979)] 等及びそれらに由来する細胞等の各種の骨髄腫細胞をいずれも使用できる。

【0061】上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルス (HVJ) 等の存在下に公知の方法に準じて行なうことができ、所望のハイブリドーマの分離もまた同様に行ない得る [Meth. in Enzymol., 73: 3 (1981); 上記続生化学実験講座等]。

【0062】また、目的とする抗体産生株の検索及び单一クローン化も常法により実施され、例えば抗体産生株の検索は、上記の免疫抗原を利用した E L I S A 法 [Meth. in Enzymol., 70: 419-439 (1980)]、ブラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニ (Ouchterlony) 法、ラジオイムノアッセイ等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法に従い実施することができる。

【0063】かくして得られるハイブリドーマからの所望抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法により培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水として得る方法等により実施できる。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。このようにして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフイー等の通常の手段により精製することができる。

【0064】かくして得られる抗体は、本発明の T S C 501 蛋白質に結合性を有することによって特徴付けられ、これは、T S C 501 蛋白質の精製、その免疫学的手法による測定乃至識別等に有利に利用できる。本発明は、かかる新規な抗体をも提供するものである。

【0065】また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の検出を行なうことができる。

【0066】かかる検出は常法に従って行なうことができ、例えば RT-PCR [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E. S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] による RNA 増幅や、ノーザンプロット解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)] や、in situ RT-PCR [Nucl. Acids Re-

s., 21: 3159-3166 (1993)]、in situ ハイブリダイゼーション等の細胞レベルでのそれら測定や、NASBA 法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350: 91-92 (1991)] 及びその他の各種方法により、良好に実施し得る。

【0067】尚、RT-PCR 法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に增幅できる該遺伝子に特有のものである限り何等限らず、本発明の遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常、これは 20 ~ 30 ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

【0068】このように、本発明は、本発明に係る T S C 501 遺伝子検出用の特異プライマー及び/又は特異プローブとして使用される DNA 断片をも提供するものである。

【0069】

【発明の効果】本発明によれば、アセチルトランスフェラーゼ活性乃至薬物代謝作用を有する、新規な T S C 501 蛋白質、これをコードする遺伝子が提供され、これらの利用によれば、生体における薬物代謝機構の解明や、新薬の開発等に有用な技術が提供される。

【0070】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

【0071】

【実施例 1】(1-1) [γ -³³P] ATP で標識した表出方法

組織特異的な手法において発現したヒト遺伝子を確認するため [γ -³³P] ATP で標識した表出方法を用いた。該方法の手順は本質的に以下に示すリニアリングの方法 (Liang P., et al., Science, 257, 967-971 (1992)) によつて行った。

【0072】即ち、13 のヒト組織 (成人脳、胎児脳、肺、肝臓、胃、脾臓、脾臓、乳腺、膀胱、胎盤、睾丸、腎臓及び心臓: クローンテック社製) の各々から単離した poly A RNA (0.2 μ g) を、ジエチルピロカーボネート処理された水の 8 μ l 中で 3'-アンカード・オリゴ d T プライマー G (T) 15 MA (M は G, A 及び C の混合液である) の 2.5 pmol と混合し、65 °C で 5 分間加熱した。この溶液に 4 μ l の 5 × ファースト・ストランド緩衝液 (BRL 社製)、2 μ l の 0.1 M DTT (BRL 社製)、1 μ l の 2.5 mM d NTPs (BRL 社製)、1 μ l のリボヌクレアーゼ・インヒビター (40 単位; TOYOBO 社製) 及び 1 μ l のスーパースクリプト II 逆転写酵素 (200 单位; BRL 社製) を加えた。各反応液の最終容量は 20 μ l であった。各溶液を 37 °C で 1 時間培養した後、30 μ l の蒸留した水の付加により 2.5 倍までに希釈し、使用時まで -20 °C で貯蔵した。

【0073】cDNA は、[γ -³³P] ATP で標識し

た（アマシャム社製）3' -アンカード・プライマーの存在下でPCRによって増幅した。このcDNAのPCR増幅は、以下のとおり実施された。即ち、各20μlのPCR混合液は、2μlのRT反応混合液、2μlの1.0×PCR緩衝液（タカラ社製）、4μlの2.5mM dNTPs、0.25μlのEx Taq DNAポリメラーゼ（5単位/ml：タカラ社製）、[γ-³³P]ATPで標識した25pmolの3' -アンカード・オリゴ-dTプライマー及び25pmolの5' -プライマー（N₀. 20、5' -GATCTGACAC-3' の任意配列を有する10-merデオキシオリゴヌクレオチド・プライマー）を含んでいた。また、PCR反応は以下の条件で行なった。即ち、95℃で3分間、40℃で5分間及び72℃で5分間を1サイクルとして行ない、それから95℃で0.5分間、40℃で2分間及び72℃で1分間を40サイクル行ない、最後に72℃で5分間反応させた。

【0074】PCR反応サンプルをエタノールで抽出し、フォルムアミド・シークエンシング染料中に再懸濁して、6%アクリルアミド7.5Mウレア・シークエンシング・ゲル上で反応させた。ゲルは固定することなしに乾燥させ、一晩オートラジオグラフィーを実施した。

【0075】(1-2) 増幅されたcDNA断片のサブ・クローニング

予め乾燥ゲルを載せた3MM濾紙上にラジオアクティブインクで印を付けておき、これとオートラジオグラムをあわせることにより、目的のcDNAを含むバンドが含まれるゲルを、3MM濾紙ごと切り出した後、300μlのdH₂Oにて1時間攪拌した。ポリアクリルアミド・ゲルと濾紙を取り除いた後、cDNAを担体として1μlの10mg/mlグリコーゲンと0.3M NaOAcの存在下、エタノール沈殿によって再回収し、10μlのdH₂Oに再溶解した。再増幅のために、5μlのこの溶液が用いられた。PCRの条件とプライマーは最初のPCRに対してと同じであった。適当な大きさの再増幅産物を第一のPCR産物として再回収し、それからそのPCR産物をpUC118ベクター（タカラ社製）のHinc II部位にクローニングした。核酸配列はABI377自動シークエンサー（アプライド・バイオ・システムズ社製）によって決定した。

【0076】上記方法にて、胎児脳(F. brain)、成人脳(A. brain)、肺(Lung)、肝臓(Liver)、胃(Stomach)、脾臓(Pancreas)、睾丸(Testis)、前立腺(Prostate)、脾臓(Spleen)、乳腺(Breast)、胎盤(Placenta)、心臓(Heart)及び腎臓(Kidney)から単離したmRNAを使用する、異なる表出パターンを比較した結果を図1に示す。

【0077】該図より、1つのプライマーの組合せでPCR増幅を行い、腎臓及び肝臓に特異的に発現した一つのPCR産物を確認した。

【0078】クローニングされ、配列決定されたこのPCR産物をTSC501aと命名した。この産物は、116ヌクレオチドからなっていた。FASTAプログラム(Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448 (1988))を使用するGenBank/EMBLデータベース中のDNA配列と、このヌクレオチド・データとの比較より、このPCR産物が他の如何なる公知のDNA配列と相同性がないことが明らかとなった。

【0079】(1-3) cDNAのスクリーニング
ヒト正常腎臓cDNAライブラリーは、オリゴ(dT)-プライムド・ヒト正常腎臓cDNAとUni-ZAP™ XR(ストラタジーン社製)を用いて、構築した。1×10⁶個のクローナーの全体を上記方法によって単離し、[α-³²P]-dCTPにて標識されたcDNA断片を用いてそのスクリーニングを行なった。陽性クローナーを選択し、それらの挿入cDNA部をpBluescript II SK(-)中のイン・ビボに切り出した。

【0080】その結果、TSC501aに対して約500のplaquesが確認された。この結果より、全RNA間の転写量は、およそ0.05%であると計算された。TSC501に相応する集合したcDNA配列(TSC501)は、227アミノ酸配列の蛋白質をコードする681ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレームを含む960ヌクレオチドを含んでいた。

【0081】推定されたTSC501蛋白質のアミノ酸配列は、そのN末端部分(Leu⁵⁵-Ala⁷⁸)にシグナルモチーフをもち、C末端部分(Gln¹⁹⁸-Pro²²⁰)にトランスメンブレンドメインを持つおり、このことから、本発明遺伝子によりコードされる蛋白質は膜蛋白質であることが明らかとなった。

【0082】更に、FASTAプログラムを使用し、公共のデータベースにおいて公知の蛋白との比較を行なった。その結果を図2に示す。

【0083】図2は、各蛋白のアミノ酸を一文字表記して、その配列を比較したものであり、図中、同一アミノ酸は反転表示してある。

【0084】該図より、TSC501蛋白質は、(1)ゲンタマイシン3' -アセチルトランスフェラーゼ(gentamicin 3'-acetyltransferase (AAC(3)-I); W. Wohlleben, et al., Mol. Gen. Genet., (1989), 217: 202-208、図中「AAC(3)-I」と表示)、(2)リボソーム蛋白-アラニンアセチルトランスフェラーゼ(ribosomal-protein-alanine acetyltransferase (Rim I); A. Yoshikawa, et al., Mol. Gen. Genet. (1987), 209: 481-488、図中「Rim I」と表示)及び(3)ストレプトセリシンアセチルトランスフェラーゼ(streptothricin acetyltransferase (Sta T); S. Horinouchi, et al., J. Bacteriol., (1987), pp. 1929-1937、図中「Sta T」と表示)とそれぞれ、29%、26%及び27%同

一であり、有意な同一性が確認された。このことは、T S C 5 0 1 蛋白質がアセチルトランスフェラーゼファミリーの新しいメンバーであることを示している。

【0085】(2) 組織における発現

組織における T S C 5 0 1 の発現プロファイルを調べるために、各種のヒト組織を用いたノーザンプロット分析を行った。

【0086】ノーザン・プロット分析には、ヒト MTN (Multiple-Tissue Northern) プロット I と II (クローニング社製) を使用した。c DNA 断片は、T3 と T7 プロモーター配列のプライマー・セットを用い、PCR によって [α -³²P] - dCTP で標識した。増幅産物を含むメンブランをプレハイブリダイズ (条件は製品のプロトコールに従った) し、そしてそれから製品のプロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行なつ

た。

【0087】ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を -80°C で 48 時間オートラジオグラフに露光した。

【0088】ヒト組織として、心臓 (Heart)、脳 (Brain)、胎盤 (Placenta)、肺 (Lung)、肝臓 (Liver)、骨格筋 (Sk. muscle)、腎臓 (Kidney)、脾臓 (Pancreas)、脾臓 (Spleen)、胸腺 (Thymus)、前立腺 (Prostate)、睾丸 (Testis)、卵巣 (Ovary)、小腸 (Small int.) 及び結腸 (Colon) を用いて行った上記試験の結果、T S C 5 0 1 に相応する約 1.0 kb 転写体が腎臓及び肝臓において、特異的に観察された。この結果は、異なる表出方法において見られる発現パターン (図 1 参照) と一致していた。

【0089】

【配列表】

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
- (ii) TITLE OF INVENTION: T S C 5 0 1 遺伝子
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3
- (iv) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING REFERENCE: B48JP
 - (C) FILING DATE: 26-MAY-1998

【0090】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 227 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Met Ala Pro Cys His Ile Arg Lys Tyr Gln Glu Ser Asp Arg Gln Trp
1 5 10 15
Val Val Gly Leu Leu Ser Arg Gly Met Ala Glu His Ala Pro Ala Thr
20 25 30
Phe Arg Gln Leu Leu Lys Leu Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Gly
35 40 45
Gly Pro Leu Ala Leu Leu Val Ser Gly Ser Trp Leu Leu Ala Leu
50 55 60
Val Phe Ser Ile Ser Leu Phe Pro Ala Leu Trp Phe Leu Ala Lys Lys
65 70 75 80
Pro Trp Thr Glu Tyr Val Asp Met Thr Leu Cys Thr Asp Met Ser Asp
85 90 95
Ile Thr Lys Ser Tyr Leu Ser Glu Arg Gly Ser Cys Phe Trp Val Ala
100 105 110

Glu Ser Glu Glu Lys Val Val Gly Met Val Gly Ala Leu Pro Val Asp
 115 120 125
 Asp Pro Thr Leu Arg Glu Lys Arg Leu Gln Leu Phe His Leu Phe Val
 130 135 140
 Asp Ser Glu His Arg Arg Gln Gly Ile Ala Lys Ala Leu Val Arg Thr
 145 150 155 160
 Val Leu Gln Phe Ala Arg Asp Gln Gly Tyr Ser Glu Val Ile Leu Asp
 165 170 175
 Thr Gly Thr Ile Gln Leu Ser Ala Met Ala Leu Tyr Gln Ser Met Gly
 180 185 190
 Phe Lys Lys Thr Gly Gln Ser Phe Phe Cys Val Trp Ala Arg Leu Val
 195 200 205
 Ala Leu His Thr Val His Phe Ile Tyr His Leu Pro Ser Ser Lys Val
 210 215 220
 Gly Ser Leu
 225

[0091]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 684 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ATGGCTCCTT	GTCACATCCG	CAAATACCAAG	GAGAGCGACC	GCCAGTGGGT	TGTGGGCTTG	60
CTCTCCGGG	GGATGGCCGA	GCATGCCCA	GCCACCTTCC	GGCAATTGCT	GAAGCTGCCT	120
CGAACCCCTCA	TACTCTTACT	TGGGGGGCCC	CTCGCCCTAC	TCCTGGTCTC	TGGATCCTGG	180
CTTCTAGCCC	TCTGTGTCAG	CATCAGCCTC	TTCCCTGCC	TGTGGTTCC	TGCCAAAAAA	240
CCCTGGACGG	AGTATGTGGA	CATGACATTG	TGCACAGACA	TGTCTGACAT	TACCAAATCC	300
TACCTGAGTG	AGCGTGGCTC	CTGCTTCTGG	GTGGCTGAGT	CTGAAGAGAA	GGTGGTGGGC	360
ATGGTAGGAG	CTCTGCCTGT	TGATGATCCC	ACCTTGAGGG	AGAAGCGGTT	GCAGCTGTTT	420
CATCTCTTG	TGGACAGTGA	GCACCGCTG	CAGGGATAG	CAAAGCCCT	GGTCAGGACT	480
GTCCCTCCAGT	TTGCCCGGGA	CCAGGGCTAC	AGTGAAGTTA	TCCTGGACAC	CGGCACCATC	540
CAGCTCTCTG	CTATGGCCCT	CTACCAAGAGC	ATGGGCTTCA	AGAAGACGGG	CCAGTCCTTC	600
TTCTGTGTGT	GGGCCAGGCT	AGTGGCTCTT	CATACAGTTTC	ATTCATCTA	CCACCTCCCT	660
TCTTCTAAGG	TAGGGAGTCT	G				681

[0092]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 960 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA(cDNA)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 169..849

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CTAGAATTCA	CGGGCCGCTG	AATTCTAGTC	CTGGATGCCA	GTGAGCGGCT	GAGAGCTGAA	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

GCTCCCTGGA CACTCAAGGC TCTTGTGGTG ACAGTCTGAC	GTAAAGGCCT GCAGGGAGGC	120
CTAGCTCTGT CTCCCTGGACT TAGAGATTTC AGACACAGAA	GTCTGTCC ATG GCT CCT	177
	Met Ala Pro	
	1	
TGT CAC ATC CGC AAA TAC CAG GAG AGC GAC CGC CAG	TGG GTT GTG GGC	225
Cys His Ile Arg Lys Tyr Gln Glu Ser Asp Arg Gln	Trp Val Val Gly	
5	10	15
TTG CTC TCC CGG GGG ATG GCC GAG CAT GCC CCA GCC ACC	TTC CCG CAA	273
Leu Leu Ser Arg Gly Met Ala Glu His Ala Pro Ala	Thr Phe Arg Gln	
20	25	30
TTG CTG AAG CTG CCT CGA ACC CTC ATA CTC TTA CTT	GGG GGG CCC CTC	321
Leu Leu Lys Leu Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu	Gly Gly Pro Leu	
40	45	50
GCC CTA CTC CTG GTC TCT GGA TCC TGG CTT CTA	GCC CTC GTG TTC AGC	369
Ala Leu Leu Leu Val Ser Gly Ser Trp Leu Leu Ala	Leu Val Phe Ser	
55	60	65
ATC AGC CTC TTC CCT GCC CTG TGG TTC CTT	GCC AAA AAA CCC TCG ACG	417
Ile Ser Leu Phe Pro Ala Leu Trp Phe Leu Ala Lys	Lys Pro Trp Thr	
70	75	80
GAG TAT GTG GAC ATG ACA TTG TGC ACA GAC ATG TCT	GAC ATT ACC AAA	465
Glu Tyr Val Asp Met Thr Leu Cys Thr Asp Met Ser	Asp Ile Thr Lys	
85	90	95
TCC TAC CTG AGT GAG CGT GGC TCC TGC TTC TGG	GTG GCT GAG TCT GAA	513
Ser Tyr Leu Ser Glu Arg Gly Ser Cys Phe Trp Val	Ala Glu Ser Glu	
100	105	110
115		
GAG AAG GTG GTG GGC ATG GTA GGA GCT CTG CCT	GTT GAT GAT CCC ACC	561
Glu Lys Val Val Gly Met Val Gly Ala Leu Pro Val	Asp Asp Pro Thr	
120	125	130
TTG AGG GAG AAG CGG TTG CAG CTG TTT CAT CTC	TTT GTG GAC AGT GAG	609
Leu Arg Glu Lys Arg Leu Gln Leu Phe His Leu Phe	Val Asp Ser Glu	
135	140	145
CAC CGT CGT CAG GGG ATA GCA AAA GCC CTG GTC	AGG ACT GTC CTC CAG	657
His Arg Arg Gln Gly Ile Ala Lys Ala Leu Val	Arg Thr Val Leu Gln	
150	155	160
TTT GCC CGG GAC CAG GGC TAC AGT GAA GTT ATC	CTG GAC ACC GGC ACC	705
Phe Ala Arg Asp Gln Gly Tyr Ser Glu Val Ile Leu	Asp Thr Gly Thr	
165	170	175
ATC CAG CTC TCT GCT ATG GCC CTC TAC CAG AGC	ATG GGC TTC AAG AAG	753
Ile Gln Leu Ser Ala Met Ala Leu Tyr Gln Ser	Met Gly Phe Lys Lys	
180	185	190
195		
ACG GGC CAG TCC TTC TTC TGT GTG TGG GCC	AGG CTA GTG GCT CTT CAT	801
Thr Gly Gln Ser Phe Phe Cys Val Trp Ala Arg	Leu Val Ala Leu His	
200	205	210
ACA GTT CAT TTC ATC TAC CAC CTC CCT TCT TCT	AAG GTA GGG AGT CTG	849
Thr Val His Phe Ile Tyr His Leu Pro Ser Ser	Lys Val Gly Ser Leu	
215	220	225
TGA TCTCTTCTG TGTGTATTGG TCAGAACATAGA	ATCCATTAG CTGTAGCAGC	902
*		
AAGCAATCCC CAACCTTCA CTGCAATGAC CTTCAATGC	AATAAAGCTT ATTGTCCA	960

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の(1-2)に従う増幅されたcDNA断

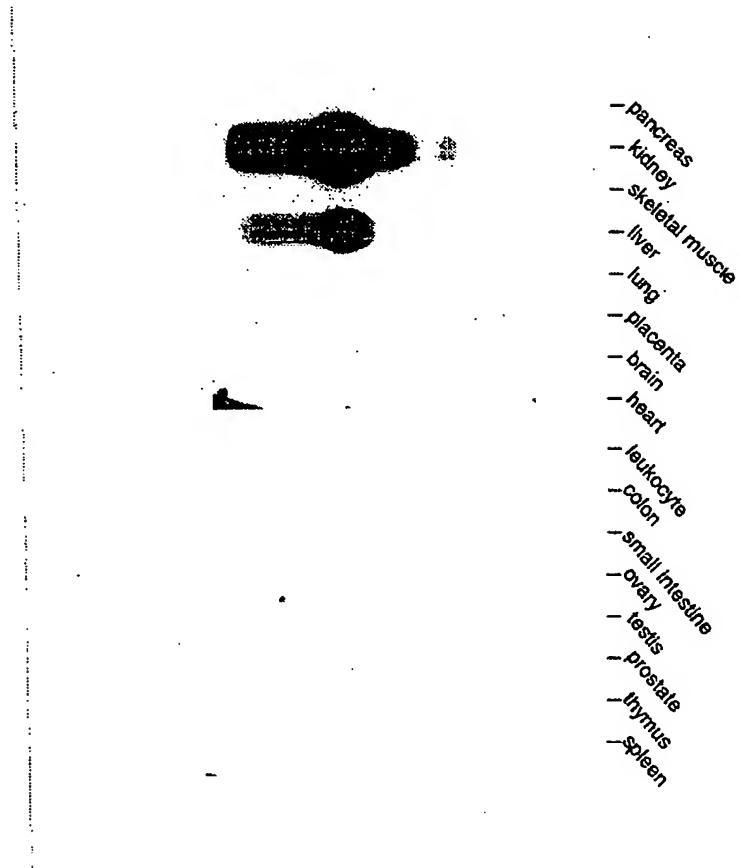
片のサブ・クローニングにおける異なるmRNA表出結果を示す図面代用写真である。

【図2】本発明TSC501遺伝子の発現蛋白と公知の

蛋白とのアミノ酸配列における相同性を比較した図である。

【図1】

図面代用写真



【図2】

TSC501	1	MAPCHIRKYQ	ESDRQNVVGL	LSRGMAEHAP	ATP	COLLKLPI	RILILLLGEP	50	
AAC(3)-I	1	-	-	-	-	-MLSSNDV	QOGSRPKTKL	50	
RimI	1	-	-	-	-	-	-	50	
Stat	1	-	-	-	-	-MTTIGHS	YFRSARPED	50	
TSC501	51	LALLIVSGSM	LLALVFSISL	FPLWVFLARK	RW	PEYVIMTL	CTMSEHITKS	100	
AAC(3)-I	51	GGSSMEHLRT	CRLGPDVQVS	MRELDLFGR	E	EGINAVTYSQ	HDPDSELEPN	100	
RimI	51	-	-	-	-	-MNTTSSL	STDLPAHYH	IEORAHAFPT	100
Stat	51	AEATEEDGS	FEISTVFEVD	VIGDGFLR	VPAI	PLVKV	FPFEGSDHE	100	
TSC501	101	YESRIGCFW	VASEEIKWVA	MVGFLPVDDP	T	REKFLCIL	HLYVDSLRKK	150	
AAC(3)-I	101	LRSKTPIAL	AAIDQDIAVE	ALASVVLPRF	E	OPRSLEYIV	PLAVSGEHRP	150	
RimI	101	SEKTFAPJQG	ERKYLAFOLTO	NGRMAYPAIT	Q	VLDEEALN	MIAMVDOYR	150	
Stat	101	DGAEDODAS	RIVAVGRADE	DLGFCAVSY	S	AWNQHNS	BLIAGAHCRC	150	
TSC501	151	QXHAKLIVP	VLOPFDQWY	SEVIQIGTI	G	LSMAMVQ	MGRKKTDSH	200	
AAC(3)-I	151	QXHAKLIVP	ERHESNLALGA	YVIXVADYG	D	PAVALMK	LSIRHESVME	200	
RimI	151	DQGHALLPS	SDDELEKXH	ATMELVRS	H	TEATLALES	GINSATIRR	200	
Stat	151	KHICSVLMPH	AADEPBRCH	CHIULEINV	W	KAJAHARR	MIFAFCDLS	200	
TSC501	201	FCWMAHLVAL	HTVHPFIYHLP	SSKVQSL	250	
AAC(3)-I	201	DIIDSET	250	
RimI	201	NWENHIDGRE	DALLMRQCSV	CNTTRANNEVG	L	FL	..	250	
Stat	201	ALHCGMSQG	SHALYMSMPC	P	250	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号 F I
C 1 2 Q 1/68 C 1 2 P 21/08
// C 1 2 P 21/08 A 6 1 K 37/48 ADQ
(C 1 2 N 15/09 Z NA
C 1 2 R 1:91)

TSC501 GENE

Patent Number: JP11332579

Publication date: 1999-12-07

Inventor(s): OZAKI KOICHI;; IWASHITA SHUICHI;; FUJIWARA TSUTOMU

Applicant(s): OTSUKA PHARMACEUT CO LTD

Requested Patent: JP11332579

Application Number: JP19980162865 19980526

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09; A61K38/43; C07K14/47; C07K16/18; C12N9/10; C12Q1/68

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new TSC501 gene having a specific amino acid sequence, containing a base sequence encoding proteins having acetyl transferase activity, capable of expression in kidney and liver-specific manner, and useful as a medicament metabolism promoter or the like.

SOLUTION: This new TSC501 gene is such one as to contain a base sequence encoding either a protein having an amino acid sequence of the formula or a protein having an amino acid sequence wherein one or more amino acids are deleted, substituted or added in the amino acid sequence of the formula and also having acetyl transferase activity, be capable of expression in kidney- and liver-specific manner, and related to medicament metabolism, therefore being useful as a medicament metabolism promoter or the like. This gene is obtained by screening a human normal kidney cDNA library constructed by conventional method using human normal kidney cDNA, using, as probe, a cDNA fragment consisting of a labeled partial sequence thereof.

Data supplied from the esp@cenet database - I2